

RAPPORT N° 28

FEVRIER 1982

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER  
SERVICES SCIENTIFIQUES CENTRAUX - BONDY

LABORATOIRE D'ENTOMOLOGIE MEDICALE



EVALUATION DES POTENTIALITES  
DE  
NOSEMA ALGERAE, VAVRA ET UNDEEN, 1970  
EN TANT QU'AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE  
ANTICULICIDIEN

par

Jean-Marc HOUGARD

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 10/19 ex 1

Cpte : B

Date : 15 MARS 1982

ex-1

- PLAN -

Pages

|   |    |
|---|----|
| I. QUELQUES RAPPELS SUR LA BIOLOGIE DES NOSEMATIDAE ....  | 1  |
| I.1. Position systématique de <u>Nosema algerae</u> .....   | 1  |
| I.2. Cycle des Nosematidae .....  | 2  |
| I.3. Observations ultrastructurales de ces formes<br>cycliques .....  | 3  |
| II. EVALUATION DES POTENTIALITES DE NOSEMA ALGERAE EN<br>TANT QU'AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE ANTICULICIDIEN ... | 4  |
| II.1. Introduction .....  | 4  |
| II.2. Matériel et méthodes .....  | 5  |
| II.2.1. L'agent pathogène .....   | 5  |
| II.2.1.1. Provenance .....  | 5  |
| II.2.1.2. Production .....  | 5  |
| II.2.1.3. Conservation .....  | 5  |
| II.2.1.4. Dosage .....  | 5  |
| II.2.2. L'hôte culicidien .....   | 6  |
| II.2.3. Méthodes et conditions d'élevage des<br>moustiques .....  | 6  |
| II.2.3.1. Méthodes d'élevage .....  | 6  |
| II.2.3.2. Conditions d'élevage .....  | 7  |
| II.2.4. Principe d'un test insecticide .....  | 7  |
| II.2.5. Exploitation des résultats .....  | 9  |
| II.2.6. Observation des Anophèles .....   | 9  |
| II.3. Résultats et discussion .....   | 10 |
| II.3.1. Production, conservation et résistance<br>des spores .....  | 10 |
| II.3.1.1. Production .....  | 10 |
| II.3.1.2. Conservation .....  | 10 |

|   |    |
|---|----|
| II.3.1.3. Résistance .....  | 12 |
| II.3.2. Action larvicide de <u>Nosema algerae</u> .....   | 13 |
| II.3.2.1. Expérience 1 .....  | 13 |
| II.3.2.1.1. Protocole expérimental .....  | 13 |
| II.3.2.1.2. Exploitation des résultats .....  | 13 |
| II.3.2.2. Expérience 2 .....  | 14 |
| II.3.2.2.1. Protocole expérimental .....  | 14 |
| II.3.2.2.2. Exploitation des résultats .....  | 15 |
| II.3.2.2.3. Etablissement des droites de<br>régression .....  | 16 |
| II.3.2.2.4. Interprétation des résultats ...  | 17 |
| II.3.2.3. Discussion .....  | 18 |
| II.3.3. Mise en évidence de l'infection parasitaire<br>chez les larves et adultes d' <u>An. stephensi</u> ..... | 19 |
| II.3.3.1. Observation à l'oeil nu et à la loupe<br>binoculaire .....  | 19 |
| II.3.3.2. Observation microscopique des larves .....  | 19 |
| II.3.3.3. Vérification de l'infection des<br>larves .....   | 20 |
| II.3.4. Effet de <u>Nosema algerae</u> sur la faune<br>non cible .....  | 21 |
| II.3.4.1. <u>Gambusia affinis</u> .....   | 21 |
| II.3.4.2. <u>Toxorhynchites amboïnensis</u> .....   | 22 |
| II.3.4.3. Discussion .....  | 22 |
| II.4. Conclusion .....  | 23 |
| ANNEXE .....  | 25 |

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## I. QUELQUES RAPPELS SUR LA BIOLOGIE DES NOSEMATIDAE

Nosema algerae, protozoaire microsporidie, est un parasite intracellulaire obligatoire, mais non permanent, de Culicidae, caractérisé par la formation de spores binucléées à filament polaire caractéristique.

### I.1. Position systématique de Nosema algerae

LEVINE et al. (80) ont révisé la classification des protozoaires qui regroupe maintenant plus de 65 000 noms d'espèces (actuelles et fossiles).

Nosema algerae se situe ainsi :

|                 |  |
|-----------------|--|
| REGNE :         | Animal                                   |
| SUPER PHYLLUM : | Protozoa                                 |
| PHYLLUM :       | Microspora (Sprague. 77)                 |
| CLASSE :        | Microsporea (Delphy. 63)                 |
| ORDRE :         | Microsporida (Balbiani. 1882)            |
| SOUS ORDRE :    | Apansporoblastina (Tuzet, Maurand, Fize, |
| FAMILLE :       | Nosematidae (Labbe) Michel, Fenwick. 71) |
| GENRE :         | Nosema (Nägeli)                          |
| ESPECE :        | algerae (Vavra et Undeen. 70)            |

Cette classification est d'une part reprise sur des concepts classiques de morphologie et d'autre part sur des techniques

plus récentes : BURGESS et al. (74) se servent de l'ultrastructure du filament polaire pour la taxonomie. KNELL et ZAM (78) effectuent des comparaisons sérologiques entre les différentes espèces de microsporidies.

## I.2. Cycle des Nosematidae

ISHIHARA (69) étudie le cycle de Nosema bombycis chez Bombyx mori, GRAY et al. (69) celui de Nosema apis chez Apis mellifera, VAVRA et UNDEEN (70) celui de Nosema algerae chez Anopheles stephensi : Ces différents cycles peuvent se regrouper en un cycle commun à tous les Nosematidae (tableau I).

Les SPORES de Nosematidae sont isolées dans le milieu extérieur et ne contiennent qu'une seule capsule polaire. Ces spores sont ensuite avalées par une larve de moustique et se fixent sur la paroi de l'intestin de l'hôte par dévagination du FILAMENT POLAIRE. Le SPOROPLASME est alors libéré et va infecter une cellule saine. C'est ainsi que se produit la phase de dispersion végétative dans l'hôte : le sporoplasme se développe et donne un plasmode ou scyncythium ou TROPHOZOITE. Ce trophozoïte donne ensuite par schizogonie des schizozoïtes ou SCHIZONTES qui redonnent à nouveau un plasmode : c'est la phase de contamination de l'hôte.

Mais ce plasmode peut s'accroître encore et donner des SPORONTES allongés, donnant deux SPOROBLASTES : c'est la phase de sporogonie qui aboutit à la formation de spores "nues" dans la cellule hôte par différenciation cellulaire.

Ces spores seront ensuite libérées dans le milieu extérieur, par destruction des tissus de l'hôte et ingérées par d'autres larves. Ce sont des formes de résistance et de dissémination, elles constituent les formes infestantes du cycle.

### I.3. Observations ultrastructurales de ces formes cycliques

SPORES : STAINIER et al. (68) décrivent l'ultra-structure des spores de Nosema spelotremae. KRINSKY (77) trouve des spores binucléées pour Nosema parkeri. SAFOIU et CALO-IANU-IORDACHEL (78) décrivent le mode de pénétration des spores par l'enveloppe nucléaire et la réaction du noyau de la cellule vis à vis de l'infection chez Nosema lymantriae.

FILAMENT POLAIRE : WEISER (59) : ce filament est plein, notion que HUGER (60) précise en l'observant rempli de tubules comparables à ceux caractéristiques des organes de locomotion des protozoaires. Pour ISHIHARA (68a), ce filament tubulaire est capable de traverser la paroi et les glandes séribigènes de Bombyx mori. Selon VAVRA (65), le filament polaire commence à se différencier comme un canal provenant de la coalescence de vésicules cytoplasmiques.

SPOROPLASME : Pour ISHIHARA (68a) et KRINSKY (77), le sporoplasme contient deux noyaux. Ces auteurs décrivent l'extrusion du sporoplasme.

SCHIZONTES : Les schizontes sont uni, bi, ou tétra-nucléés (CANNING et HULLS 70). La schizogonie est amitotique (CANNING 62) : Un schizonte à quatre noyaux produit quatre corps uninucléés qui donnent chacun un sporonte.

SPORONTES : SPRAGUE et al (68) décrivent l'ultra-structure d'un Nosema et s'attardent sur les différentes étapes de la sporogonie. Pour CANNING et HULLS (70), les sporontes sont allongés et donnent deux sporoblastes. Les spores de Nosema algerae sont ovales, leurs dimensions sont les suivantes : longueur 3,0 X 4,3 $\mu$  ; largeur 1,8 X 2,5 $\mu$  ; elles possèdent un filament de longueur variant de 40 à 60 microns.

## II. EVALUATION DES POTENTIALITES DE NOSEMA ALGERAE EN TANT QU'AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE ANTICULICIDIEN

### II.1. Introduction

Si la lutte contre les insectes n'a pour but, dans les pays tempérés, que l'élimination d'une simple nuisance sans portée épidémiologique, il n'en est pas de même dans les pays chauds, où bien souvent, l'insecte est vecteur de maladies. De toutes les méthodes de lutte utilisées actuellement, la lutte chimique, si elle se heurte à deux limitations majeures, à savoir les phénomènes de résistance aux insecticides et les problèmes de pollution, n'en joue pas moins le rôle le plus important.

C'est pourquoi la lutte biologique, qui dans un passé encore récent (début des années 60), semblait vouée à l'oubli, connaît actuellement un regain d'intérêt : l'Organisation Mondiale de la Santé, qui considère ce problème depuis plusieurs années déjà, encourage le développement d'agents biologiques pathogènes susceptibles d'être utilisés pour le contrôle des arthropodes vecteurs de maladies.

Nosema algerae, protozoaire microsporidie, va faire l'objet de cet exposé. Considéré comme agent de lutte biologique potentiel, je vais tenter d'évaluer ses propriétés insecticides. Ce type d'étude doit être préalable à toutes applications ultérieures sur le terrain. Mais contrairement à d'autres agents biologiques pathogènes tel Bacillus thuringiensis, producteur d'une protéine toxique à effet insecticide classique, Nosema algerae provoque chez l'hôte culici-

dien, une véritable infection parasitaire. Nous sommes donc en présence d'un phénomène purement biologique, nécessitant peut-être une approche nouvelle quant aux méthodes d'études et à l'interprétation des résultats.

## II.2. Matériel et méthodes

### II.2.1. L'agent pathogène

#### II.2.1.1. Provenance

Les quelques milligrammes de Nosema algerae ont été fournis par le Dr WEIDHAAS de l'United States Department Federal Research Service, Gainesville, Florida, USA.

#### II.2.1.2. Production

Cette souche, baptisée "Panama variety", et prélevée au mois de décembre 1980, provient d'adultes d'Heliothis zea (lépidoptère).

#### II.2.1.3. Conservation

Les spores étaient en solution dans un tampon citraté à PH 7,6 et à l'obscurité. Certains problèmes se sont posés quant à leur conservation (voir chapitre résultats et discussion).

#### II.2.1.4. Dosage

Les concentrations sont exprimées durant tout cet exposé en spores par ml de solution. Elles sont déterminées par comptage de ces spores sur cellule de Malassez (tableau VI). La solution mère initiale, trop concentrée, rendant toute lecture impossible, une première dilution est réalisée. Le comptage est ensuite effectué dans les 25 rectangles quadrillés. Il suffit ensuite de multiplier ce nombre par 4 pour avoir la concentration en spores par  $\text{mm}^3$ .

Ainsi, sur la première photographie du tableau VI, l'un des rectangles contient 54 spores. Lors de la lecture au microscope, les 25 rectangles totalisaient 1451 spores soit 5804 spores par  $\text{mm}^3$  soit  $5,8 \cdot 10^6$  spores par ml.



### II.2.2. L'hôte culicidien

Toutes les expérimentations ont été effectuées sur Anopheles stephensi, souche STRM2, maintenu en élevage dans les insectarium de l'O.R.S.T.O.M à Bondy.

Les raisons de ce choix sont les suivantes : Anopheles stephensi est disponible en grande quantité à l'insectarium.

C'est un bon matériel d'élevage.

C'est aussi un bon matériel d'expérimentation : UNDEEN (76) estime que sur cinq espèces de moustiques testés, An. stephensi et An. albimanus sont les plus sensibles.

MADDOX et al. (77) ont analysé six espèces de moustiques du Pakistan pour leur sensibilité à Nosema algerae. L'infection s'est révélée forte notamment chez An. stephensi (Liston). Pour HAZARD et LOFGREN (71), l'Anophèle semble être l'hôte principal des Nosema. La distribution géographique naturelle du parasite semble confirmer cette préférence pour le genre Anopheles :

AFRIQUE : des Nosema algerae furent isolés au Libéria (59) et au Nigéria (72) chez Anopheles gambiae (Giles).

AMERIQUE CENTRALE : des Nosema algerae furent isolés au Salvador (71 et 78) chez Anopheles albimanus (Wiedemann).

ASIE : des Nosema très semblables à Nosema algerae furent isolés au Pakistan chez Anopheles stephensi (Liston).

### II.2.3. Méthodes et conditions d'élevage des moustiques

Pour éviter tout risque de contamination de l'insectarium, (les microsporidies sont facilement disséminables), les élevages ont été réalisés dans une serre, à proximité du laboratoire.

#### II.2.3.1. Méthodes d'élevage

Les larves d'Anophèles, élevées dans de l'eau permutée et en cristallisoir, sont nourries avec de la poudre de biscuit pour souris. Les nymphes sont ensuite isolées et placées dans des cages d'élevage. Les imagos sont nourris sur jus sucré (Mâle et Femelle) et sur cobaye (Femelle). Quelques heures après le premier repas de sang, des pondoires

sont installés; ils sont retirés après chaque ponte et déposés à nouveau dans un cristalliseur pour l'éclosion des jeunes larves.

La durée d'un cycle biologique complet de l'oeuf à l'oeuf est environ de 20 jours. Cette durée peut varier suivant les conditions extérieures.

#### II.2.3.2. Conditions d'élevage

Température ambiante : Extrêmes

- minimum 18°C
- maximum 42°C

Moyenne - 23/25°C

Du fait de l'absence de thermostat, la température varie dans des proportions assez considérables pouvant aller de 18°C (La nuit) à 42°C (journée fortement ensoleillée). Ceci n'a pas été sans poser quelques problèmes, notamment pour les cobayes qu'il fallait retirer aux heures les plus chaudes.

Lumière : Les jours de faible luminosité, en plus de la lumière du jour, des lampes au néon étaient allumées.

Humidité : Pour obtenir un taux d'humidité supérieur à celui régnant dans la serre, le matériel d'élevage était placé dans un petit enclos de panneaux de plastique transparent. Il suffisait alors de déposer un simple bac rempli d'eau pour atteindre 70 à 80% d'humidité.

PH : Le PH de l'eau d'élevage (eau permutée) était de 5. (T° : 20/24°C)

#### II.2.4. Principe d'un test insecticide

Les larves de moustiques (stade variable suivant la manipulation) sont élevées par groupes de 25 dans des gobelets en plastique transparent contenant 150 ml d'eau permu-tée, ou bien la même quantité de solution aqueuse de spores. Selon les cas, 2 ou 4 gobelets seront utilisés pour chaque concentration. A intervalles de temps réguliers, des prélè-

vements sont effectués afin de quantifier un certain nombre de paramètres (tableaux III, IV, V) :

V désigne le nombre de larves vivantes au moment du prélèvement.

M : nombre de larves ou de nymphes mortes en cours de test.

D : nombre de disparus par rapport au nombre initial de larves.

N : nombre de nymphes vivantes.

A : nombre d'émergences (adultes).

T : nombre initial de larves.

S : somme des disparus (D) et des morts (M).

Postulat : Les disparus sont comptés comme morts (voir chapitre résultats et discussion).

S représente alors la mortalité préimaginale cumulée.

Dès l'apparition des nymphes, chaque gobelet est coiffé d'un autre gobelet, permettant ainsi la récupération et le comptage des adultes (A). Ce comptage est confirmé par le nombre d'exuvies nymphales flottant à la surface de l'eau d'élevage.

La méthode décrite ici s'apparente à la méthode normalisée O.M.S 1963. Mais de par le mode d'action insecticide tout à fait particulier de Nosema algerae, quelques modifications ont dû être apportées :

- Nécessité de débiter les tests avec de jeunes larves (2ème ou 3ème stade) : l'effet pathogène n'apparaissant que plusieurs jours après le début de l'expérience.
- Nécessité d'un apport nutritif pour permettre aux jeunes larves de se développer et d'atteindre les stades suivants.

Tous les tests ont été réalisés au laboratoire, à une température de 20/22°C. Des précautions ont été prises pour éviter tout risque de contamination.

## II.2.5. Exploitation des résultats

Il s'agit maintenant de savoir si les résultats obtenus peuvent s'inscrire dans le cadre d'une loi mathématique définie. La méthode employée ici est celle généralement utilisée pour tout insecticide classique (chimique). On porte sur papier millimétré les probits de mortalité en fonction du logarithme de la dose (concentration en spores). Dans le cas d'un système gaussien-logarithmique, la représentation graphique aboutit à une droite de régression (droite de Henry), permettant une détermination aisée des doses léthales 50 et 90 (DL 50 - DL 90).

Pour savoir si les points expérimentaux permettent le tracé d'une droite, il est au préalable nécessaire d'effectuer un calcul de chi deux ( $\chi^2$ ). Cet indice permet de déterminer la valeur de l'écart entre les effectifs observés et ceux de l'hypothèse que l'on cherche à vérifier (en l'occurrence une droite).

Lorsque le taux de mortalité chez le témoin est compris entre 5 et 20%, celui ci est alors corrigé par la formule dite d'ABBOTT :

$$\%Mc = \frac{\%Mo - \%Mt}{100 - \%Mt} \times 100$$

Mc : mortalité corrigée

Mo : mortalité observée

Mt : mortalité observée chez le témoin.

## II.2.6. Observation des Anophèles

Pour déterminer l'infection des larves et des adultes, le matériel est tout d'abord éclairci dans du liquide de Berlèse, entre une heure et douze heures suivant la taille de l'échantillon et le degré d'éclaircissement désiré. Le matériel est ensuite légèrement écrasé entre lame et lamelle puis monté dans de l'alcool polyvinylique (PVA). MADDOX et al. (77) observent l'infection par simple écrasement des moustiques.

Dans le cas d'une infection massive, une simple observation à la loupe binoculaire suffit à la diagnose.

Coloration des spores : UNDEEN et MADDOX (73) fixent tout d'abord les spores dans le Méthanol absolu (5 mn) et les colorent ensuite pendant 15 à 20 mn dans du GIEMSA à 5%.

### II.3. Résultats et discussion

#### II.3.1. Production, conservation et résistance des spores

##### II.3.1.1. Production

UNDEEN et MADDOX (73) estiment que Nosema algerae infecte seulement les moustiques "per os". Il se développe aussi dans un certain nombre d'arthropodes quand les spores sont injectées dans l'hémocoèle. Ainsi une simple larve d'Heliothis zea produit jusqu'à 2000 fois plus de spores qu'un moustique.

STREET et al. (80) : La production de Nosema algerae a été successivement réussie dans 3 lignées de culture de cellules d'insectes, Trichoplusia ni, Heliothis zea, Mamestra brassicae.

UNDEEN et ALGER (71) décrivent une simple méthode pour séparer les spores de Nosema algerae du corps du moustique : le "Ludox gradient spore purification technique".

KELLY et KNELL (79) disent en substance que leur technique produit des spores suffisamment pures pour un traitement "per os" des moustiques. Cette méthode est plus rapide que la "triangulation method" de COLE mais moins raffinée que la méthode précédente.

GOCHNAUER et MARGETTS (80) utilisent la centrifugation par flux continu pour concentrer les spores de Nosema apis à partir d'un grand nombre d'abeilles infectées.

##### II.3.1.2. Conservation

Les spores de Nosema algerae, en solution dans un tampon citraté à PH 7,6 et à l'obscurité, ont été placées, sitôt après leur arrivée, au réfrigérateur (4°C).

Le 5 Mai 80, une première dilution au 1/1000 était réalisée

à partir de 1 ml de la solution mère complété à 1 litre d'eau permutée.

Lors de la détermination de la concentration sur cellule de Malassez, la solution était bien homogène, les spores isolées (cliché 1 du tableau VI). Mais le 15 Mai 80, après donc dix jours de conservation à l'obscurité et à la température du laboratoire (20°C), et lors d'une ultime vérification avant un test, j'ai constaté une forte agglomération des spores par petits paquets de 5 à 40 unités (Les spores isolées étant rares).

pour tenter de faire disparaître ces agrégats, j'ai procédé aux trois opérations suivantes :

- Agitation des spores pendant une douzaine d'heures par un agitateur magnétique.
- Addition de quelques gouttes de potasse à 1%.
- Addition d'un tensio-actif (mouillant), en l'occurrence un simple détergent.

Dans les trois cas, l'agrégation a persisté.

La disparition des agrégats semblant irréversible, nous avons cherché à déterminer le ou les facteurs empêchant leur formation. Le 15 Mai 80, 4 tubes à essai contenant chacun quelques ml d'une solution fraîchement préparée, homogène, se répartissaient ainsi :

- Tube N°1 : Addition d'un mouillant - T 22°C
- Tube N°2 : Absence de mouillant - T 22°C
- Tube N°3 : Addition d'un mouillant - T 4°C
- Tube N°4 : Absence de mouillant - T 4°C

Résultats (le 30 Mai)

- Tube N°1 : Peu de spores isolées, beaucoup d'agrégats
- Tube N°2 : " " " " " " " " " " " " " " " " " "
- Tube N°3 : Rares agrégats, solution pratiquement homogène
- Tube N°4 : " " " " " " " " " " " " " " " " " "

Le froid apparait donc comme un facteur empêchant l'agglomération des spores. Pour être plus complet, il aurait fallu étudier l'influence des ions  $H^+$  en diluant par exemple les spores dans des eaux de PH différents (eau permutée, eau du robinet, eau minérale).

KELLY et ANTHONY (79) Conservent les spores de Nosema algerae à PH 7, 0,17 M de tampon standard Mc Ilvaine, et à 4°C jusqu'à utilisation.

Nota : L'état d'agrégation des spores entraine des difficultés à déterminer la valeur de la concentration. Ainsi la solution à  $10^6$  sp/ml du 5 Mai titrait, le 15 Mai, entre  $10^5$  et  $10^7$  sp/ml suivant la présence ou non des agrégats sur la cellule. Pour plus de précautions, les suspensions de spores seront donc préparées et titrées juste avant les expérimentations.

#### II.3.1.3. Résistance

Pour ALGER et UNDEEN (70), ni l'eau, ni l'acide chlorhydrique à 1%, ni la soude à 1%<sup>ne</sup> tuent les spores, mais une exposition toute la nuit à 0,1% de formol, ou 20 mn d'exposition à 95% d'alcool éthylique, ou encore un séchage de 5 jours les tue.

KELLY et ANTHONY (79) estiment que la lumière solaire agit sur les spores traitées, plus sur l'intensité de l'infection que sur son incidence. Les rayons ultra-violets, à action bactéricide bien connue, diminuent à la fois l'incidence et l'intensité de l'infection.

VAVRA (80) : Les spores de Microsporidies sont assez faciles à conserver, viables pendant des mois, voir pour certaines espèces des années.

TEETOR-BARSCH et KRAMER (79) constate que la lyophilisation des spores de Nosema algerae abaisse légèrement le taux d'infection chez Anopheles stephensi.

## II.3.2. Action larvicide de Nosema algerae

### II.3.2.1. Expérience 1

#### II.3.2.1.1. Protocole expérimental

Les concentrations de Nosema utilisées étaient les suivantes :  $5.10^2$  ,  $10^3$  ,  $5.10^3$  ,  $10^4$  ,  $5.10^4$  ,  $10^5$  et  $5.10^5$  sp/ml.

A raison de 4 gobelets par concentration, il y a donc, en comptant le lot témoin, 8 séries de 4 gobelets contenant chacun 150 ml de solution et 25 larves d'Anophèles au 2ème stade. Le jeudi 4 Juin, ces larves étaient mises en contact avec la suspension de spores. Les premières observations étaient effectuées régulièrement toutes les 24 heures, à partir du mardi 9 Juin, et ce pendant 8 jours.

Un tableau détaillé (tableau III), rend compte de toutes ces mesures, donnant pour chaque concentration les valeurs de V , M , D , N , A , T et S dont je rappelle brièvement la signification : V vivant, M mort, D disparu, N nymphe, A adulte, T nombre initial de larves, S somme des morts et des disparus.

#### II.3.2.1.2. Exploitation des résultats

Pour permettre au lecteur d'interpréter les résultats comme il l'entend, j'ai laissé sur les tableaux III, IV et V les cinq premiers paramètres. En effet, les deux dernières colonnes, qui seules seront prises en considération, peuvent prêter à discussion : S, somme des disparus et des morts représente la mortalité préimaginale (cumulée) par rapport à l'effectif total de départ (T). Je considère donc les disparus au même titre que les morts. La raison en est la suivante :

Le tableau III montre une très nette augmentation des disparus dans la plus forte concentration ( $5.10^5$  sp/ml) par rapport au témoin. Cette différence est à mon avis due au fait qu'un certain nombre de larves, mortes ou affaiblies par l'infection, ont été avalées par leurs congénères.

Le nombre total de larves étant égal à 100, S représente ici le pourcentage de mortalité préimaginale cumulée.



Le tableau III peut alors se simplifier de la façon suivante :

| B \ A          | 5 jrs | 7 jrs | 9 jrs | 11 jrs | 13 jrs |
|----------------|-------|-------|-------|--------|--------|
|                | S     | S     | S     | S      | S      |
| T              | 17%   | 27%   | 40%   | 44%    | 62%    |
| $5 \cdot 10^2$ | 17%   | 20%   | 24%   | 29%    | 47%    |
| $10^3$         | 13%   | 21%   | 34%   | 38%    | 68%    |
| $5 \cdot 10^3$ | 17%   | 26%   | 30%   | 30%    | 45%    |
| $10^4$         | 17%   | 21%   | 24%   | 29%    | 49%    |
| $5 \cdot 10^4$ | 17%   | 25%   | 31%   | 40%    | 60%    |
| $10^5$         | 15%   | 23%   | 25%   | 27%    | 54%    |
| $5 \cdot 10^5$ | 27%   | 54%   | 71%   | 71%    | 91%    |

Pourcentage de mortalité  
en fonction de la dose

A : temps de contact avec la solution

B : concentration en sp/ml

S : pourcentage de mortalité préimaginale cumulée

T : lot témoin

Un point important se dégage de ce tableau : quelque soit le jour de lecture, les 6 premières concentrations ne provoquent pas plus de mortalité que chez le témoin, mais contrastent très nettement avec la dernière ( $5 \cdot 10^5$  sp/ml), qui semble avoir un effet larvicide évident.

### II.3.2.2. Expérience 2

#### II.3.2.2.1. Protocole expérimental

Il n'est pas indispensable d'exploiter plus en détail le tableau précédent, sinon de resserrer la fourchette entre les deux dernières concentrations :  $2 \cdot 10^5$ ,  $4 \cdot 10^5$  et  $6 \cdot 10^5$  spores/ml.

La quantité de spores étant limitée, il y a cette fois non pas 4 mais 2 gobelets contenant chacun 150 ml de solution et 25 larves d'Anophèles au stade 3.

Les larves ont été mises au contact de la solution le Lundi

15 Juin. Les premières mesures étaient effectuées régulièrement toutes les 24 heures, à partir du Mercredi 17 Juin et ce pendant 16 jours (tableau IV).

Nota : des relevés ont aussi été effectués les 15 et 17ème jours (voir paragraphe suivant).

#### II.3.2.2.2. Exploitation des résultats

Comme dans l'expérience précédente, le tableau IV. peut se simplifier de la façon suivante :

| B \ A             | 2jrs | 4jrs | 6jrs | 8jrs | 10jrs | 12jrs | 14jrs | 16jrs | 18jrs |
|-------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                   | S'   | S'   | S'   | S'   | S'    | S'    | S'    | S'    | S'    |
| T                 | 4%   | 4%   | 12%  | 12%  | 30%   | 36%   | 42%   | 44%   | 50%   |
| 2.10 <sup>5</sup> | 2%   | 2%   | 6%   | 14%  | 32%   | 38%   | 46%   | 66%   | 82%   |
| 4.10 <sup>5</sup> | 4%   | 8%   | 14%  | 18%  | 38%   | 42%   | 64%   | 78%   | 90%   |
| 6.10 <sup>5</sup> | 2%   | 4%   | 16%  | 24%  | 36%   | 40%   | 58%   | 82%   | 88%   |

#### Pourcentage de mortalité en fonction de la dose

A : temps de contact avec la solution

B : concentration en sp/ml

S' : Pourcentage de mortalité préimaginaire cumulée (le rapport S/T est converti en pourcentage)

T : lot témoin

De ce tableau se dégage deux points essentiels :

1) Le taux de mortalité chez le témoin devient supérieur au bout de quelques jours à 20%. Il n'est donc plus possible d'employer la formule d'Abbott et par conséquent, calculer le pourcentage de mortalité corrigée nécessaire à la représentation gaussio-logarithmique.

2) Les premiers jours de contact avec la solution, l'effet larvicide de Nosema algerae ne semble pas se manifester. Si l'on porte sur graphe le taux de mortalité en fonction du temps (graphe I), on constate que les différentes courbes de mortalité ne commencent à diverger qu'à par-

tir du 9-10ème jours (temps de "latence"). A partir de ce temps, plus la dose est importante, plus la courbe s'écarte de celle du témoin.

Compte tenu de ce temps de "latence", nous considérons le 10ème jours (J-10) de contact avec la solution comme le début de l'expérience, et corrigeons T et S en fonction de ce zéro relatif.

Exemple : le rapport S/T du 16ème jour chez le témoin était de 22/50. Après J<sub>10</sub> + 6 jours, ce rapport devient alors égal à 22-15/50-15 soit 7/35 (tableau V).

La mortalité chez le témoin étant cette fois comprise entre 5 et 20%, celle ci sera corrigée par la formule d'Abbott.

#### II.3.2.2.3. Etablissement des droites de régression

La représentation graphique log-probit implique la conversion d'un certain nombre de données détaillées dans le tableau suivant :

| B \ A | 5 jours |      | 6 jours |      | 7 jours |      | 8 jours |      |
|-------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
|       | pmc     | pro  | pmc     | pro  | pmc     | pro  | pmc     | pro  |
| 5,301 | 4,20    | 3,30 | 18,4    | 4,10 | 37,5    | 4,70 | 48,5    | 4,95 |
| 5,602 | 29,9    | 4,48 | 33,8    | 4,55 | 55,6    | 5,14 | 79,8    | 5,80 |
| 5,778 | 20,8    | 4,16 | 24,6    | 4,30 | 64,8    | 5,38 | 76,6    | 5,70 |

A : temps de contact avec la solution

B : logarithme de la concentration

pmc : pourcentage de mortalité corrigée

pro : probit de la mortalité corrigée (donné par la table de BLISS)

Le nombre de doses étant de 3, on travaille avec un degré de liberté. Le calcul du  $X^2$  est effectué à l'aide d'un Ordinateur "WANG" qui donne les valeurs numériques suivantes :

$$5 \text{ jours : } X^2 = 1,817$$

$$7 \text{ jours : } X^2 = 0,003$$

$$6 \text{ jours : } X^2 = 0,813$$

$$8 \text{ jours : } X^2 = 1,184$$

Le  $\chi^2$  critique, pour une probabilité de 0,05 et pour 1 degré de liberté, étant de 3,840, il est dans tous les cas non significatif : je peux donc me permettre d'ajuster tous ces points en des droites de régression (graphe II : probit de mortalité en fonction du log de la dose).

Les DL 50 et 90 nous sont données par simple lecture sur la courbe, et confirmées par l'ordinateur :

|         | DL 50                   | DL 90                   |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| 5 jours | 15,76 . 10 <sup>5</sup> | 116,1 . 10 <sup>5</sup> |
| 6 jours | 65,47 . 10 <sup>5</sup> | 1737 . 10 <sup>5</sup>  |
| 7 jours | 3,267 . 10 <sup>5</sup> | 24,24 . 10 <sup>5</sup> |
| 8 jours | 1,892 . 10 <sup>5</sup> | 10,10 . 10 <sup>5</sup> |

#### II.3.2.2.4. Interprétation des résultats

L'effet larvicide de Nosema algerae sur Anopheles stephensi semble donc obéir à une loi très fréquente en biologie, la loi gaussio-logarithmique.

Cependant, deux points importants le différencient de toutes autres insecticides classiques :

1) La loi gaussio-log n'est applicable qu'après un temps de latence d'une dizaine de jours. Il faut donc, pour avoir un effet important, utiliser des jeunes stades. Dans les pays chauds, où la période larvaire est beaucoup plus réduite, il me paraît difficile d'atteindre les stades préimaginaux.

REYNOLDS (71) infecte Culex fatigans en faisant directement éclore les oeufs de moustiques dans une suspension de spores de Nosema stegomyiae.

2) Cette Microsporidie n'est efficace sur les larves qu'à des concentrations difficilement applicables sur le terrain. Ainsi, par exemple, il faut 10<sup>6</sup> spores/ml pour obtenir 90% de mortalité larvaire au bout de 18 jours de traitement!

UNDEEN et ALGER (75) : pour que Nosema algerae soit utilisé comme un larvicide microbiologique, il doit être à forte concentration pour produire 100% d'infection.

### II.3.2.3. Discussion

Interprétation du temps de "latence" : il peut s'agir

- soit d'un temps d'incubation des spores pendant lequel celles-ci, dans l'intestin de l'hôte, ne libèrent pas le sporoplasme : il n'y a donc pas infection cellulaire immédiate.
- soit d'un temps pendant lequel les larves, bien qu'étant infectées au niveau cellulaire, ne manifestent pas encore de symptômes suffisants pour les affaiblir ou les tuer.
- soit encore de la taille des spores, trop importante pour être ingérées par les larves. Mais un examen microscopique de stades 3 a révélé la présence indiscutable de Nosema dans leur tube digestif.

Si Nosema algerae ne peut être utilisé comme larvicide, par contre, l'infection des imagos semble beaucoup plus avantageuse.

Pour ANTHONY et al. (78), des infections par N. algerae réduisent nettement la capacité de reproduction et la longévité d'An. albimanus ainsi que le nombre et la fertilité des oeufs.

UNDEEN et ALGER (75) estiment qu'un grand nombre d'adultes d'An. stephensi infectés permet la dispersion des spores de Nosema algerae (contamination de nouveaux sites larvaires par cadavres d'adultes ou oeufs souillés ou fèces).

HAQ et al. (81) pensent que la diminution de la fécondité chez les femelles d'An. stephensi infectées par N. algerae est notamment due à une diminution du taux de reproduction.

ANTHONY et al. (72), travaillant sur Nosema stegomyiae, montrent que des concentrations de  $5.10^2$ ,  $5.10^3$ , et  $5.10^4$  sp/ml entraînent une mortalité négligeable des larves et des nymphes d'Anopheles albimanus, mais provoquent respectivement 30-40, 80-90, et 95-100% d'infection chez les adultes.

Ainsi, les dix adultes que j'ai obtenu lors de l'expérience II à des concentrations de 2, 4 et  $6.10^5$  sp/ml se sont tous révélés infectés (voir chapitre II.3.3.).

Il est évident qu'une transmission transovarienne augmenterait encore l'intérêt de Nosema algerae en favorisant le maintien de l'infection dans une colonie de moustiques. VAVRA (80), ANDREADIS et HALL (79), HAZARD et WEISER (68), KELLENS et WILLS (62) ont étudié la transmission transovarienne de divers Microsporidies chez les moustiques. Cependant aucun travail sur Nosema algerae n'est à signaler.

Dans une perspective de lutte antipaludique, il serait intéressant de voir s'il existe une compétition entre les plasmodium et Nosema algerae.

UNDEEN et ALGER (75), ANTHONY et al. (72) pensent que les Nosema réduiraient les risques de transmission du paludisme chez des femelles d'Anopheles vectrices.

#### II.3.3. Mise en évidence de l'infection parasitaire chez les larves et adultes d'Anopheles stephensi

Lors des tests insecticides des deux expériences précédentes, j'ai déterminé la mortalité larvaire sans me préoccuper du taux d'infection des moustiques. Je me suis simplement limité à mettre en évidence cette infection sur quelques spécimens (larves et adultes) dans le seul but d'en montrer les effets.

##### II.3.3.1. Observation à l'oeil nu et à la loupe bino- culaire

Dans le cas d'une forte infection, de grosses tumeurs blanchâtres sont visibles à l'oeil nu au niveau de certains segments abdominaux. L'observation à la loupe bino-  
culaire montre que chaque segment infecté s'enfle considérablement. Lors des tests, ces larves n'ont jamais atteint le stade adulte.

##### II.3.3.2. Observation microscopique des larves

Tableau VII : comparaison entre une larve saine d'Anophèle au 4ème stade (Clichés du haut : X 90 et X 150) et une larve faiblement infectée (Clichés du bas : X 120 et X 240). Cette larve, lors des tests, paraissait tout à fait saine et avait un comportement identique à celui de ses congénères.

Tableau VIII -en haut : larve 4ème stade fortement infectée.  
X120 : les tâches marrons correspondent à des amas de spores.  
X 1500 : observation de ces mêmes spores au plus fort grossissement du microscope (objectif à immersion).

-en bas : adultes d'*Anophèles* infectés.

X 200 : sous le poids de la lamelle, l'abdomen libère une grande quantité de spores.

X 800 : observation de ces mêmes spores à un plus fort grossissement.

#### II.3.3.3. Vérification de l'infection des larves

Pour vérifier que les larves jugées fortement infectées l'étaient réellement, nous avons procédé au test suivant :

Deux gobelets contiennent chacun 60 ml d'eau permutée et 30 larves saines d'*Anopheles stephensi* 2ème stade. Le premier gobelet fait office de témoin, les larves sont nourries dès le début de l'expérience. Le deuxième gobelet contient 12 cadavres de larves présumées infectées, ces moustiques ne seront nourris qu'une fois les cadavres dévorés.

L'expérience a débuté le Lundi 29 Juin. Les mesures ont été effectuées toutes les 48 heures, et ce pendant 14 jours.

|           | 2 jrs | 4 jrs | 6 jrs | 8 jrs | 10 jrs | 12 jrs | 14 jrs |
|-----------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
|           | S/T   | S/T   | S/T   | S/T   | S/T    | S/T    | S/T    |
| 1er gob.  | 0/30  | 0/30  | 0/30  | 2/30  | 5/30   | 7/30   | 7/30   |
| 2ème gob. | 0/30  | 1/30  | 4/30  | 8/30  | 13/30  | 20/30  | 27/30  |

S/T : nombre de morts par rapport à l'effectif total de départ

A partir du 8ème jour, la mortalité dans le 2ème gobelet s'accroît de façon significative par rapport au témoin : il n'est donc pas besoin d'exploiter plus en détail ces résultats pour constater que l'infection présumée chez les cadavres est bien effective.

Cette expérience montre également que les cadavres infectés constituent un des facteurs favorisant le maintien des microsporidies au sein de la colonie de moustiques.

MADDOX et al. (77) observent l'infection par simple écrasement des moustiques, tous ceux qui avaient des Microsporidies intracellulaires étaient considérés comme infectés.

Pour CANNING et HULLS (70), Nosema algerae attaque presque tous les tissus du corps de la larve, de la pupa et de l'adulte, y compris les ovaires.

HAZARD et LOFGREN (71) indiquent chez différents moustiques les premiers sites d'infection de Nosema sp.

JAFRI et al. (76) étudient le lieu et la nature de l'infection dans l'hôte en effectuant des examens histo-pathologiques.

FOX et WEISER (59) étudient les sites d'infection de Nosema stegomyiae chez An. gambiae.

#### II.3.4. Effet de Nosema algerae sur la faune non cible

Deux prédateurs de moustiques ont été testés

##### II.3.4.1. Gambusia affinis

Matériel et méthode : 2 cristallisoirs remplis d'eau du robinet se répartissent ainsi :

Le 1er cristallisoir contient 4 Gambusies, il fait office de témoin.

Le 2ème cristallisoir contient 4 Gambusies et 50 cadavres de larves d'Anophèles nettement infectées.

L'eau est oxygénée à l'aide d'un "bulleur", et changée toutes les semaines, les poissons sont nourris par un aliment pour poissons d'aquarium (Tetramin).

2 heures après le début de l'expérience, les poissons du 2ème cristallisoir ont dévoré tous les cadavres infectés.

Résultats : un mois après (le 31 Juillet), les poissons étaient en parfaite santé, aussi bien dans le 1er que dans le 2ème cristallisoir.

Nosema algerae ne semble donc pas pathogène pour Gambusia affinis.



#### II.3.4.2. Toxorhynchites amboïnensis

Matériel et méthode : le 15 Juillet, 2 gobelets en plastique contenant chacun 150 ml d'eau distillée et 2 larves de Toxorhynchites 4ème stade, sont placés dans une étuve à 25°C, et sous un éclairage artificiel au Néon maintenu allumé de 9h à 18h. Des boîtes de pétri sont également installées pour maintenir un taux élevé d'humidité. Un des gobelets fait office de témoin : les larves de Toxorhynchites sont nourries le 1er jour avec 25 larves d'Anophèles vivantes et fortement infectées, et les autres jours avec le même nombre de larves saines. Nota : les Toxorhynchites ne se nourrissent pas de cadavres.

Résultats : Le 20 juillet, la nymphose s'est effectuée correctement chez les 4 larves.

Le 23 juillet, l'émergence des adultes s'effectue elle aussi correctement. Ces derniers ont été éclaircis 12 heures dans le Berlèse puis montés entre lame et lamelle dans de l'alcool polyvinilique (PVA).

Après observation microscopique et comparaison des deux lots, aucune infection n'a été notée. Il serait toutefois prudent de procéder à des essais plus importants avant de conclure à la non infection des Toxorhynchites par Nosema algerae.

#### II.3.4.3. Discussion

VAN ESSEN et ANTHONY (76) déterminent la sensibilité de 9 prédateurs de moustiques à Nosema algerae : seul Notonecta undulata est sensible à N. algerae après s'être nourri de larves infectées. Gambusia affinis est insensible. COSTA et BRADLEY (80) : les Nosema sont aussi connus pour hyperparasiter des trématodes digéniens (Fasciola hepatica), parasites de Lymnaea cubensis. Pour SAVAGE (75), Toxorhynchites rutilus septentrionalis est insensible à Nosema algerae.

ALGER et al. (80), UNDEEN et ALGER (76) ont infecté des souris par injection hypodermique de spores de Nosema algerae, mais l'infection s'est limitée aux extrémités. UNDEEN (75) démontre que N. algerae est capable de se développer dans des cellules de mammifères.

#### II.4. Conclusion

Contrairement à d'autres microorganismes pathogènes producteurs de protéines toxiques, Nosema algerae est un parasite intracellulaire obligatoire provoquant, chez l'hôte culicidien, une véritable infection parasitaire.

De part ce phénomène purement biologique, le mode d'action de cette Microsporidie doit faire l'objet d'une approche nouvelle, différente des microorganismes toxiques ou des insecticides classiques.

Ainsi, il ressort de ces quelques pages que Nosema algerae pourrait agir à deux niveaux dans l'épidémiologie d'une maladie transmise par un moustique. Prenons le cas du paludisme :

Niveau 1 - Contrôle des populations de vecteurs : si l'action larvicide de Nosema algerae ne semble pas efficace, l'infection des adultes semble par contre beaucoup plus avantageuse :

- 1) L'infection des adultes demande des doses plus faibles de produit "insecticide"
- 2) La longévité des adultes diminue
- 3) On observe une baisse du taux de reproduction et de la fécondité chez les femelles
- 4) Le nombre et la fertilité des oeufs diminuent
- 5) Les cadavres d'adultes ou les fèces ou les oeufs souillés favorisent la dispersion des spores
- 6) Dans le cas d'une transmission transovarienne, il y a passage de l'infection à la progéniture

Niveau 2 - Compétition entre le parasite lui même et le plasmodium

- 1) Par diminution de la longévité des adultes, empêchant ainsi le plasmodium de terminer son cycle
- 2) Par occupation des mêmes sites d'infection
- 3) Par détournement des éléments nutritifs de l'hémolymphe

Si quelques applications sur le terrain ont été tentées (HAZARD 72, ANTHONY et al. 78), plusieurs étapes semblent

encore nécessaires avant toutes opérations sur une large échelle.

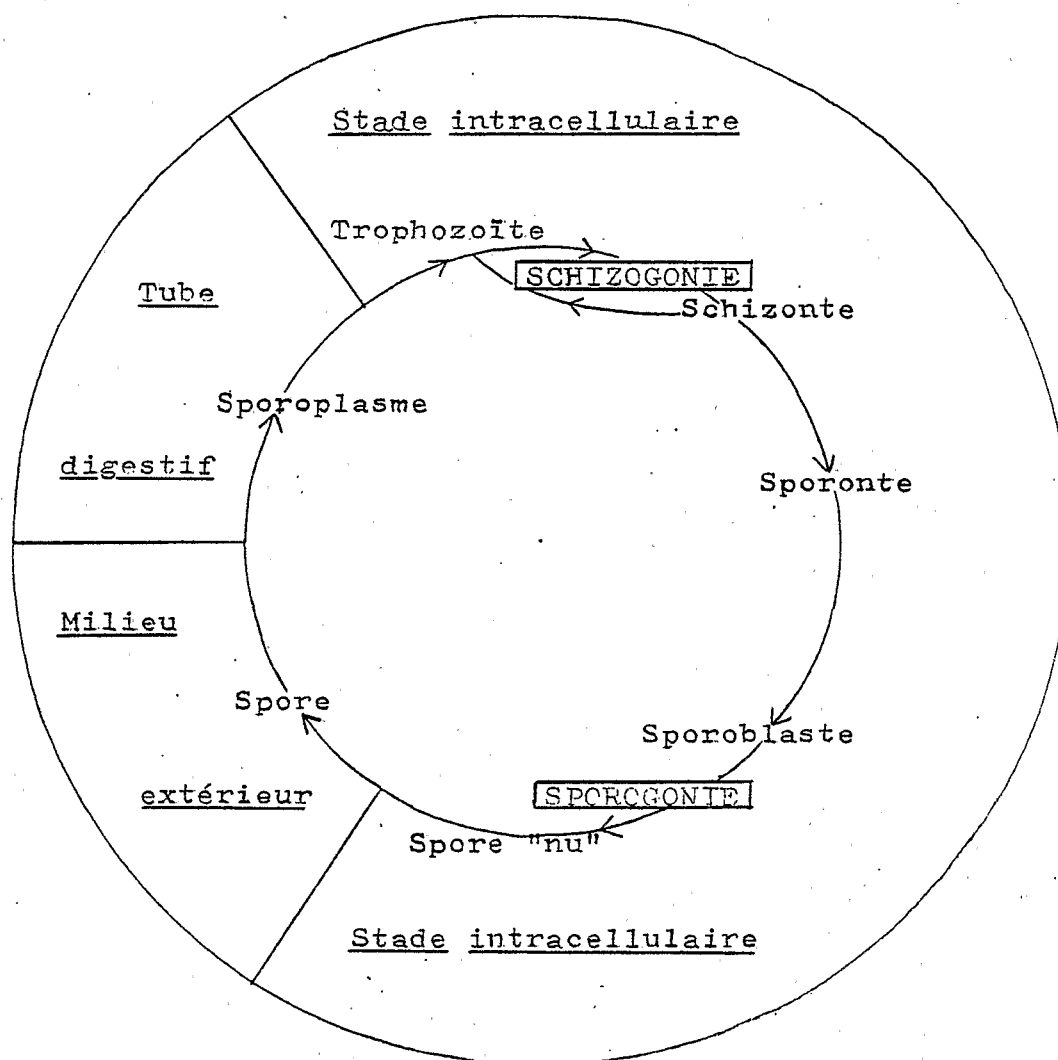
Il est donc peut-être encore prématuré d'émettre une opinion quant à l'avenir de Nosema algerae en tant qu'agent de lutte anticulicidien. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent incitent les recherches à se poursuivre dans ce domaine (transmission transovarienne, influence du substrat, compétition avec le plasmodium, production industrielle des spores, etc).

- ANNEXE -

Tableaux I à VIII

Graphes I et II

CYCLE TYPE DES NOSEMATIDAE



## SENSIBILITE DE DIFFERENTS MOUSTIQUES A

Nosema algerae

| ESPECES   | SENSIBI-<br>LITE | REFERENCES   |
|---|------------------|--|
| <u>Anopheles stephensi</u>                        | +++              | Canning et Hulls, 70;<br>Hazard et Lofgren, 71;<br>Savage, 75; Undeen, 76. |
| <u>An. meias</u>                                  | +++              | Canning et Hulls, 70;  |
| <u>An. gambiae</u>                                | +++              | Canning et Hulls, 70;  |
| <u>An. albimanus</u>                              | +++              | Savage, 75; Undeen, 76.  |
| <u>An. quadrimaculatus</u>                        | +++              | Hazard et Lofgren, 71.   |
| <u>An. quadrimaculatus</u>                        | ++               | Undeen, 76.  |
| <u>An. atroparvus</u>                             | +                | Undeen, 76.  |
| <u>Culex tarsalis</u>                             | ++               | Savage, 75.  |
| <u>Cx. nigripalpus</u>                            | ++               | Savage, 75.  |
| <u>Cx. pipiens quinque-<br/>fasciatus</u>         | +                | Canning et Hulls, 70.  |
| <u>Cx. pipiens pipiens</u>                        | +                | Canning et Hulls, 70;<br>Undeen, 76.                                       |
| <u>Cx. salinarius</u>                             | +                | Hazard et Lofgren, 71.   |
| <u>Aedes aegypti</u>                              | +                | Canning et Hulls, 70.<br>Savage, 75.                                       |
| <u>Ae. taeniorhynchus</u>                         | +                | Savage, 75.  |
| <u>Psorophora ciliata</u>                         | -                | Savage, 75.  |
| <u>Toxorhynchites rutilus<br/>septentrionalis</u> | -                | Savage, 75.  |

+++ Haute sensibilité  
++ Sensibilité moyenne

+ Faible sensibilité  
- Non sensible

| Temps de<br>Dose contact<br>avec la<br>en<br>spores/ml | 5 Jours |   |   |   |   |     |    | 7 Jours |   |    |   |   |     |    | 9 Jours |    |    |   |   |     |    | 11 Jours |   |    |   |   |     |    | 13 Jours |   |    |   |   |     |    |
|--|---------|---|---|---|---|-----|----|---------|---|----|---|---|-----|----|---------|----|----|---|---|-----|----|----------|---|----|---|---|-----|----|----------|---|----|---|---|-----|----|
|  | V       | M | D | N | A | T   | S  | V       | M | D  | N | A | T   | S  | V       | M  | D  | N | A | T   | S  | V        | M | D  | N | A | T   | S  | V        | M | D  | N | A | T   | S  |
| T  | 21      | 0 | 4 | 0 | 0 | 100 | 17 | 19      | 0 | 6  | 0 | 0 | 100 | 27 | 17      | 0  | 8  | 0 | 0 | 100 | 40 | 16       | 0 | 9  | 0 | 0 | 100 | 44 | 7        | 2 | 12 | 2 | 2 | 100 | 62 |
|  | 20      | 2 | 3 | 0 | 0 |     |    | 18      | 1 | 6  | 0 | 0 |     |    | 14      | 6  | 9  | 0 | 0 |     |    | 12       | 3 | 10 | 0 | 0 |     |    | 6        | 1 | 18 | 0 | 0 |     |    |
|  | 23      | 1 | 1 | 0 | 0 |     |    | 19      | 1 | 5  | 0 | 0 |     |    | 15      | 0  | 10 | 0 | 0 |     |    | 15       | 0 | 10 | 0 | 0 |     |    | 9        | 1 | 13 | 1 | 1 |     |    |
|  | 19      | 1 | 5 | 0 | 0 |     |    | 17      | 0 | 8  | 0 | 0 |     |    | 14      | 3  | 8  | 0 | 0 |     |    | 13       | 0 | 12 | 0 | 0 |     |    | 9        | 1 | 14 | 1 | 0 |     |    |
| 5.10 <sup>2</sup>                                      | 22      | 1 | 2 | 0 | 0 | 100 | 17 | 21      | 0 | 4  | 0 | 0 | 100 | 20 | 20      | 1  | 4  | 0 | 0 | 100 | 24 | 19       | 0 | 6  | 0 | 0 | 100 | 29 | 14       | 0 | 9  | 2 | 0 | 100 | 47 |
|  | 20      | 4 | 1 | 0 | 0 |     |    | 19      | 0 | 6  | 0 | 0 |     |    | 18      | 0  | 7  | 0 | 0 |     |    | 17       | 0 | 8  | 0 | 0 |     |    | 10       | 1 | 11 | 2 | 1 |     |    |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 22      | 0 | 3  | 0 | 0 |     |    | 22      | 0  | 3  | 0 | 0 |     |    | 20       | 0 | 5  | 0 | 0 |     |    | 9        | 0 | 13 | 2 | 1 |     |    |
|  | 18      | 0 | 7 | 0 | 0 |     |    | 18      | 0 | 7  | 0 | 0 |     |    | 16      | 0  | 9  | 0 | 0 |     |    | 15       | 0 | 10 | 0 | 0 |     |    | 11       | 0 | 13 | 1 | 0 |     |    |
| 10 <sup>3</sup>  | 19      | 0 | 6 | 0 | 0 | 100 | 13 | 17      | 1 | 7  | 0 | 0 | 100 | 21 | 17      | 0  | 8  | 0 | 0 | 100 | 34 | 17       | 0 | 8  | 0 | 0 | 100 | 38 | 9        | 1 | 12 | 2 | 1 | 100 | 68 |
|  | 22      | 1 | 2 | 0 | 0 |     |    | 22      | 1 | 2  | 0 | 0 |     |    | 19      | 0  | 6  | 0 | 0 |     |    | 18       | 1 | 6  | 0 | 0 |     |    | 10       | 0 | 13 | 1 | 1 |     |    |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 19      | 2 | 4  | 0 | 0 |     |    | 14      | 4  | 7  | 0 | 0 |     |    | 14       | 1 | 10 | 0 | 0 |     |    | 3        | 4 | 17 | 1 | 0 |     |    |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 21      | 0 | 4  | 0 | 0 |     |    | 16      | 2  | 7  | 0 | 0 |     |    | 13       | 3 | 9  | 0 | 0 |     |    | 4        | 3 | 18 | 0 | 0 |     |    |
| 5.10 <sup>3</sup>                                      | 20      | 0 | 5 | 0 | 0 | 100 | 17 | 17      | 0 | 8  | 0 | 0 | 100 | 26 | 15      | 0  | 10 | 0 | 0 | 100 | 30 | 15       | 0 | 10 | 0 | 0 | 100 | 30 | 5        | 0 | 15 | 2 | 3 | 100 | 45 |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 18      | 1 | 6  | 0 | 0 |     |    | 17      | 1  | 7  | 0 | 0 |     |    | 17       | 0 | 8  | 0 | 0 |     |    | 7        | 0 | 13 | 4 | 1 |     |    |
|  | 20      | 0 | 5 | 0 | 0 |     |    | 20      | 0 | 5  | 0 | 0 |     |    | 20      | 0  | 5  | 0 | 0 |     |    | 20       | 0 | 5  | 0 | 0 |     |    | 16       | 0 | 5  | 3 | 1 |     |    |
|  | 20      | 0 | 5 | 0 | 0 |     |    | 19      | 1 | 5  | 0 | 0 |     |    | 18      | 0  | 7  | 0 | 0 |     |    | 18       | 0 | 7  | 0 | 0 |     |    | 11       | 2 | 10 | 2 | 0 |     |    |
| 10 <sup>4</sup>  | 21      | 0 | 4 | 0 | 0 | 100 | 17 | 21      | 0 | 4  | 0 | 0 | 100 | 21 | 19      | 1  | 5  | 0 | 0 | 100 | 24 | 17       | 1 | 7  | 0 | 0 | 100 | 29 | 8        | 0 | 14 | 2 | 1 | 100 | 49 |
|  | 20      | 0 | 5 | 0 | 0 |     |    | 20      | 0 | 5  | 0 | 0 |     |    | 19      | 1  | 5  | 0 | 0 |     |    | 18       | 1 | 6  | 0 | 0 |     |    | 12       | 1 | 10 | 1 | 1 |     |    |
|  | 18      | 0 | 7 | 0 | 0 |     |    | 15      | 0 | 10 | 0 | 0 |     |    | 15      | 0  | 10 | 0 | 0 |     |    | 14       | 0 | 11 | 0 | 0 |     |    | 3        | 0 | 15 | 6 | 1 |     |    |
|  | 24      | 0 | 1 | 0 | 0 |     |    | 23      | 0 | 2  | 0 | 0 |     |    | 23      | 0  | 2  | 0 | 0 |     |    | 22       | 0 | 3  | 0 | 0 |     |    | 12       | 0 | 9  | 1 | 3 |     |    |
| 5.10 <sup>4</sup>                                      | 22      | 0 | 3 | 0 | 0 | 100 | 17 | 19      | 0 | 6  | 0 | 0 | 100 | 25 | 19      | 0  | 6  | 0 | 0 | 100 | 31 | 17       | 1 | 7  | 0 | 0 | 100 | 40 | 6        | 0 | 18 | 1 | 0 | 100 | 60 |
|  | 21      | 0 | 4 | 0 | 0 |     |    | 19      | 0 | 6  | 0 | 0 |     |    | 17      | 0  | 8  | 0 | 0 |     |    | 14       | 1 | 8  | 0 | 0 |     |    | 6        | 0 | 14 | 3 | 2 |     |    |
|  | 20      | 0 | 5 | 0 | 0 |     |    | 19      | 0 | 6  | 0 | 0 |     |    | 17      | 0  | 8  | 0 | 0 |     |    | 15       | 0 | 10 | 0 | 0 |     |    | 9        | 0 | 11 | 1 | 4 |     |    |
|  | 20      | 3 | 2 | 0 | 0 |     |    | 18      | 1 | 6  | 0 | 0 |     |    | 16      | 1  | 8  | 0 | 0 |     |    | 12       | 2 | 11 | 0 | 0 |     |    | 6        | 0 | 17 | 1 | 1 |     |    |
| 10 <sup>5</sup>  | 22      | 0 | 3 | 0 | 0 | 100 | 15 | 19      | 0 | 6  | 0 | 0 | 100 | 23 | 18      | 1  | 6  | 0 | 0 | 100 | 25 | 15       | 0 | 8  | 2 | 0 | 100 | 27 | 6        | 0 | 11 | 2 | 3 | 100 | 54 |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 19      | 3 | 3  | 0 | 0 |     |    | 19      | 0  | 6  | 1 | 0 |     |    | 18       | 0 | 7  | 0 | 0 |     |    | 6        | 2 | 13 | 1 | 2 |     |    |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 23      | 0 | 2  | 0 | 0 |     |    | 22      | 1  | 1  | 0 | 0 |     |    | 22       | 0 | 2  | 0 | 0 |     |    | 8        | 2 | 12 | 2 | 1 |     |    |
|  | 17      | 0 | 8 | 0 | 0 |     |    | 21      | 0 | 9  | 0 | 0 |     |    | 15      | 0  | 10 | 0 | 0 |     |    | 13       | 0 | 10 | 0 | 0 |     |    | 7        | 1 | 13 | 1 | 0 |     |    |
| 5.10 <sup>5</sup>                                      | 12      | 7 | 6 | 0 | 0 | 100 | 27 | 10      | 6 | 9  | 0 | 0 | 100 | 54 | 3       | 11 | 11 | 0 | 0 | 100 | 71 | 3        | 8 | 14 | 0 | 0 | 100 | 71 | 1        | 6 | 18 | 0 | 0 | 100 | 91 |
|  | 17      | 3 | 5 | 0 | 0 |     |    | 14      | 0 | 11 | 0 | 0 |     |    | 11      | 4  | 10 | 0 | 0 |     |    | 11       | 2 | 12 | 0 | 0 |     |    | 3        | 4 | 17 | 0 | 0 |     |    |
|  | 23      | 0 | 2 | 0 | 0 |     |    | 9       | 8 | 11 | 0 | 0 |     |    | 11      | 5  | 9  | 0 | 0 |     |    | 5        | 7 | 13 | 0 | 0 |     |    | 0        | 5 | 19 | 0 | 1 |     |    |
|  | 21      | 0 | 4 | 0 | 0 |     |    | 13      | 4 | 8  | 0 | 0 |     |    | 10      | 5  | 10 | 0 | 0 |     |    | 10       | 1 | 14 | 0 | 0 |     |    | 0        | 2 | 19 | 1 | 0 |     |    |

Tableau -III-

Evaluation des différents paramètres "insecticides" en fonction des concentrations de Nosema algerae en suspension dans l'eau d'élevage. Lecture toutes les 48 heures

V,M,D,N,A,T et S: Voir chapitre II.2.4.  
"Principe d'un test insecticide"

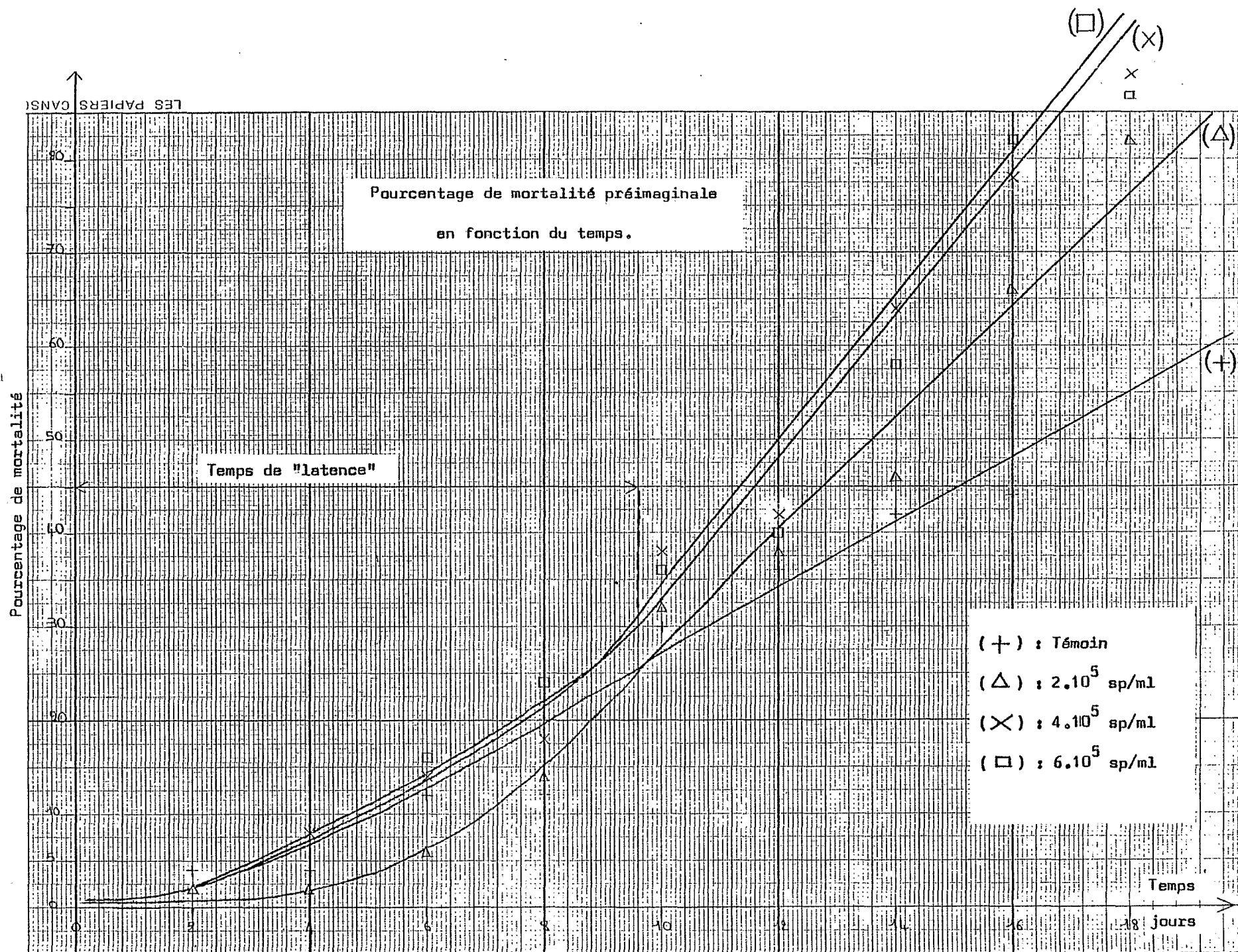


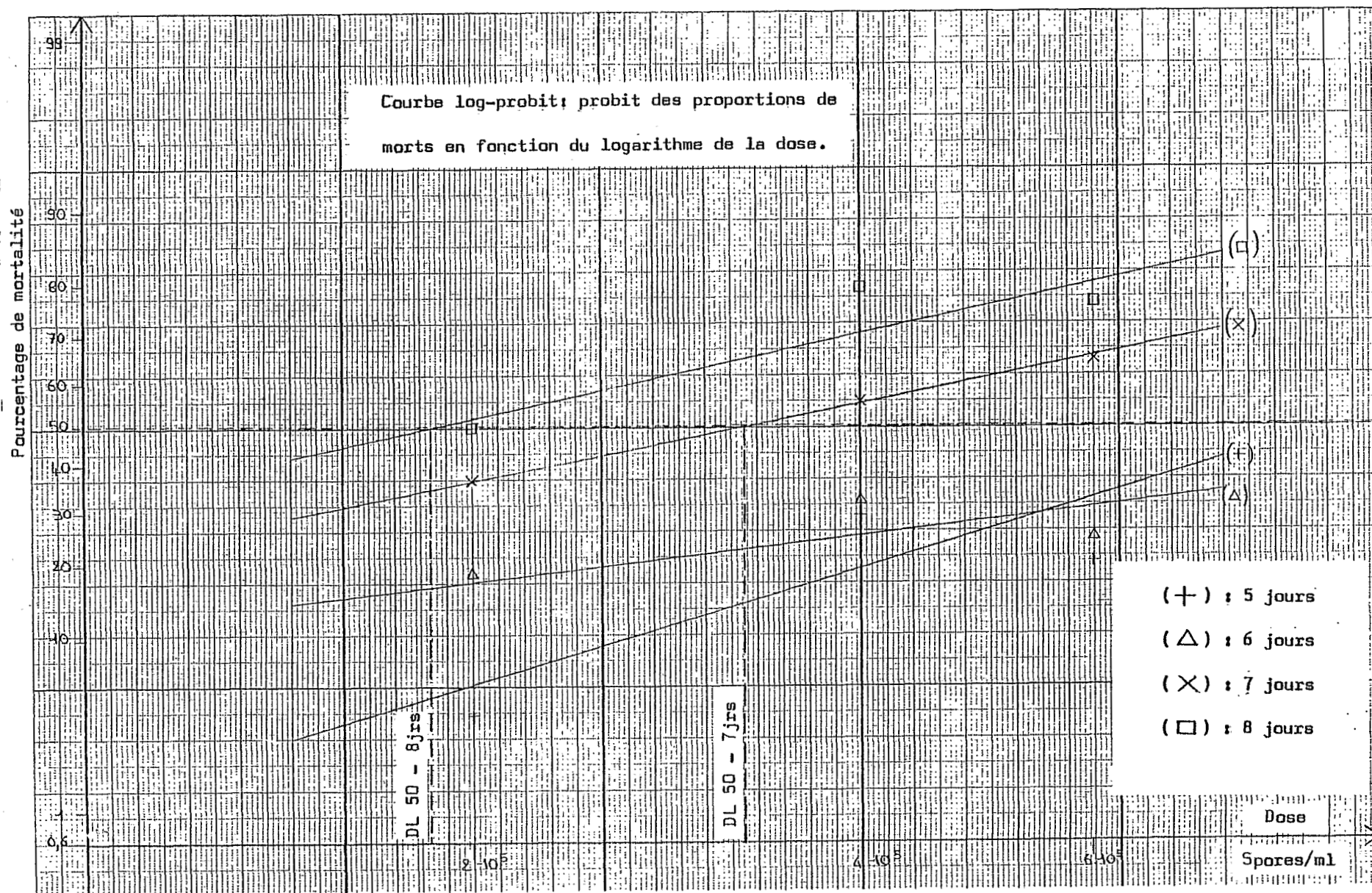


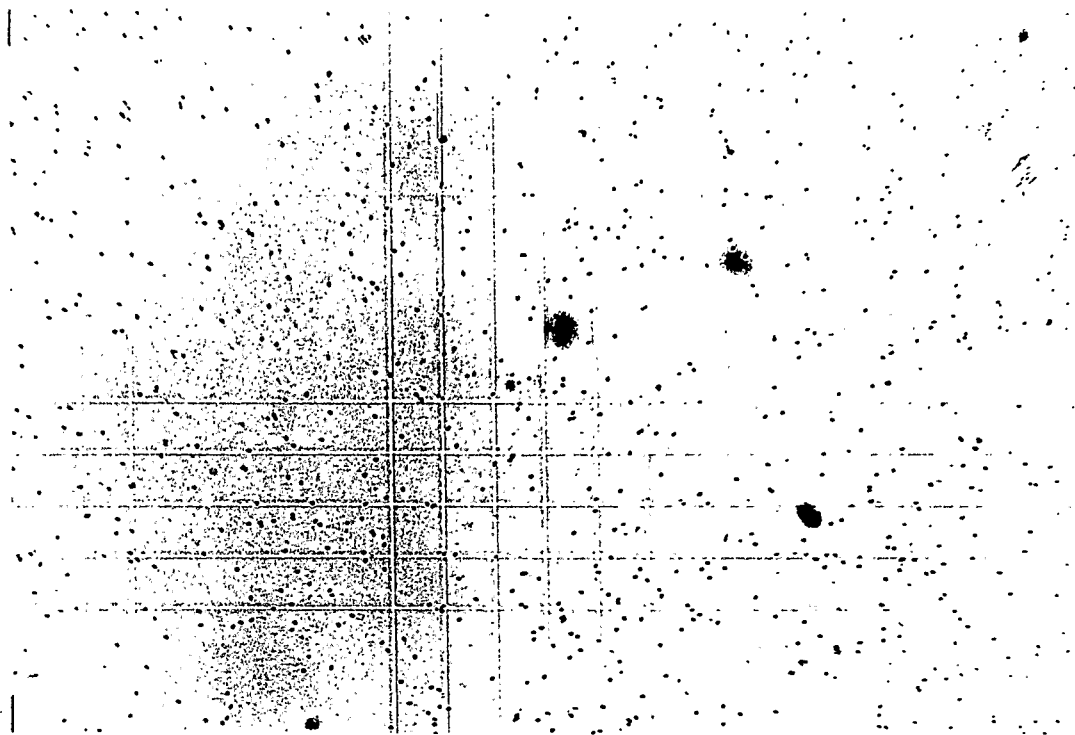
Evaluation des différents paramètres "insecticides" \* en fonction  
des concentrations de Nosema algerae en suspension dans l'eau  
d'élevage. Lecture toutes les 24 heures.

| Temps de<br>contact<br>avec la<br>Dose - sol.<br>en<br>spores/ml | 15 Jours<br>( J-10 + 5Jrs) |   |    |   |   |    | 16 Jours<br>( J-10 + 6Jrs) |    |    |    |   |   | 17 Jours<br>( J-10 + 7Jrs) |    |    |    |    |   | 18 Jours<br>( J-10 + 8Jrs) |    |    |    |    |    |   |   |    |    |
|--|----------------------------|---|----|---|---|----|----------------------------|----|----|----|---|---|----------------------------|----|----|----|----|---|----------------------------|----|----|----|----|----|---|---|----|----|
|  | V                          | M | D  | N | A | T  | S                          | V  | M  | D  | N | A | T                          | S  | V  | M  | D  | N | A                          | T  | S  | V  | M  | D  | N | A | T  | S  |
| T  | 11                         | 1 | 13 | 0 | 0 | 16 | 5                          | 9  | 2  | 13 | 1 | 0 | 16                         | 6  | 8  | 3  | 13 | 1 | 0                          | 16 | 7  | 7  | 3  | 13 | 2 | 0 | 16 | 7  |
|  | 18                         | 0 | 7  | 0 | 0 | 19 | 1                          | 18 | 0  | 7  | 0 | 0 | 19                         | 1  | 17 | 1  | 6  | 1 | 0                          | 19 | 1  | 13 | 1  | 8  | 3 | 0 | 19 | 3  |
| 2.10 <sup>5</sup>  | 7                          | 3 | 13 | 1 | 1 | 14 | 5                          | 3  | 5  | 14 | 2 | 1 | 14                         | 10 | 1  | 7  | 15 | 1 | 1                          | 14 | 11 | 0  | 10 | 14 | 0 | 1 | 14 | 13 |
|  | 12                         | 1 | 10 | 2 | 0 | 20 | 6                          | 8  | 4  | 10 | 3 | 0 | 20                         | 8  | 7  | 4  | 10 | 3 | 1                          | 20 | 9  | 5  | 6  | 11 | 2 | 1 | 20 | 12 |
| 4.10 <sup>5</sup>  | 4                          | 3 | 15 | 2 | 1 | 13 | 6                          | 2  | 6  | 15 | 0 | 2 | 13                         | 9  | 0  | 8  | 15 | 0 | 2                          | 13 | 11 | 0  | 8  | 15 | 0 | 2 | 13 | 11 |
|  | 6                          | 2 | 13 | 3 | 1 | 18 | 8                          | 4  | 5  | 13 | 2 | 1 | 18                         | 11 | 1  | 8  | 14 | 1 | 1                          | 18 | 15 | 1  | 8  | 14 | 0 | 2 | 18 | 15 |
| 6.10 <sup>5</sup>  | 7                          | 4 | 11 | 1 | 2 | 15 | 5                          | 2  | 10 | 11 | 0 | 2 | 15                         | 11 | 0  | 10 | 13 | 0 | 2                          | 15 | 13 | 0  | 10 | 13 | 0 | 2 | 15 | 13 |
|  | 7                          | 6 | 9  | 1 | 2 | 17 | 7                          | 2  | 11 | 9  | 1 | 2 | 17                         | 12 | 2  | 12 | 9  | 0 | 2                          | 17 | 13 | 2  | 12 | 9  | 0 | 2 | 17 | 13 |

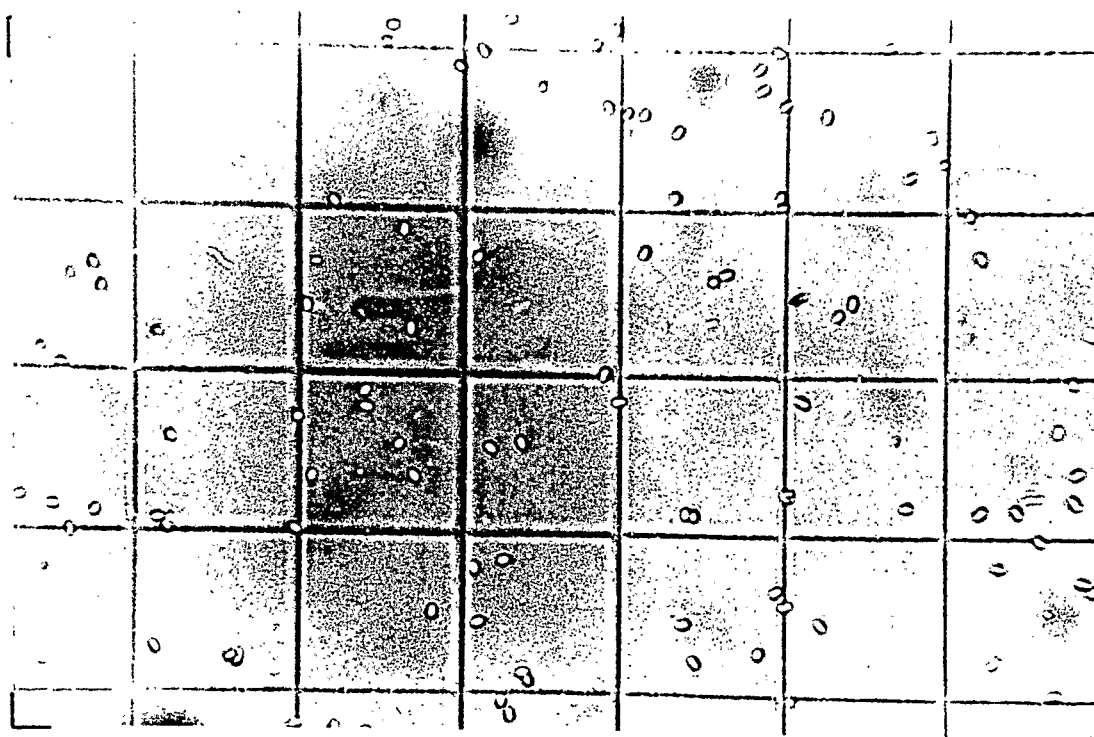
\* T et S sont corrigés par rapport à J-10 qui fait office de zéro relatif.







Comptage de spores de Nosema algerae  
sur cellule de Malassez. X 140



Comptage de spores de Nosema algerae  
sur cellule de Malassez. X 420



Anopheles stephensi

Larve 4ème stade non infectée.

X 90



Anopheles stephensi

Larve 4ème stade non infectée.

X 150



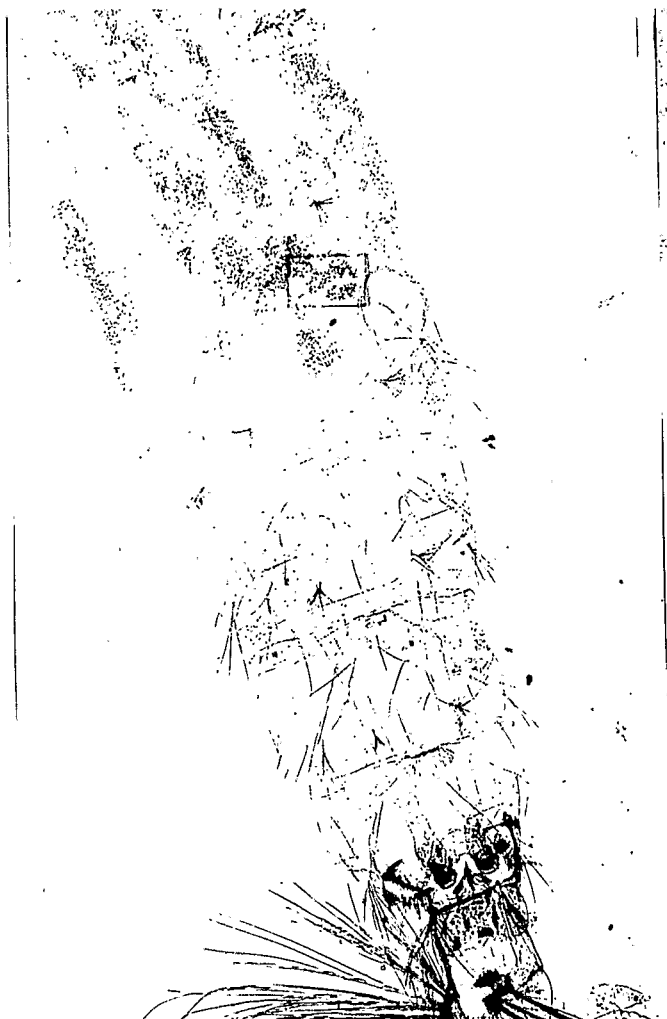
Anopheles stephensi - Larve 4ème  
stade infectée : tumeurs abdo-  
minales.

X 150



Anopheles stephensi - Larve 4ème  
stade infectée : tumeurs abdo-  
minales.

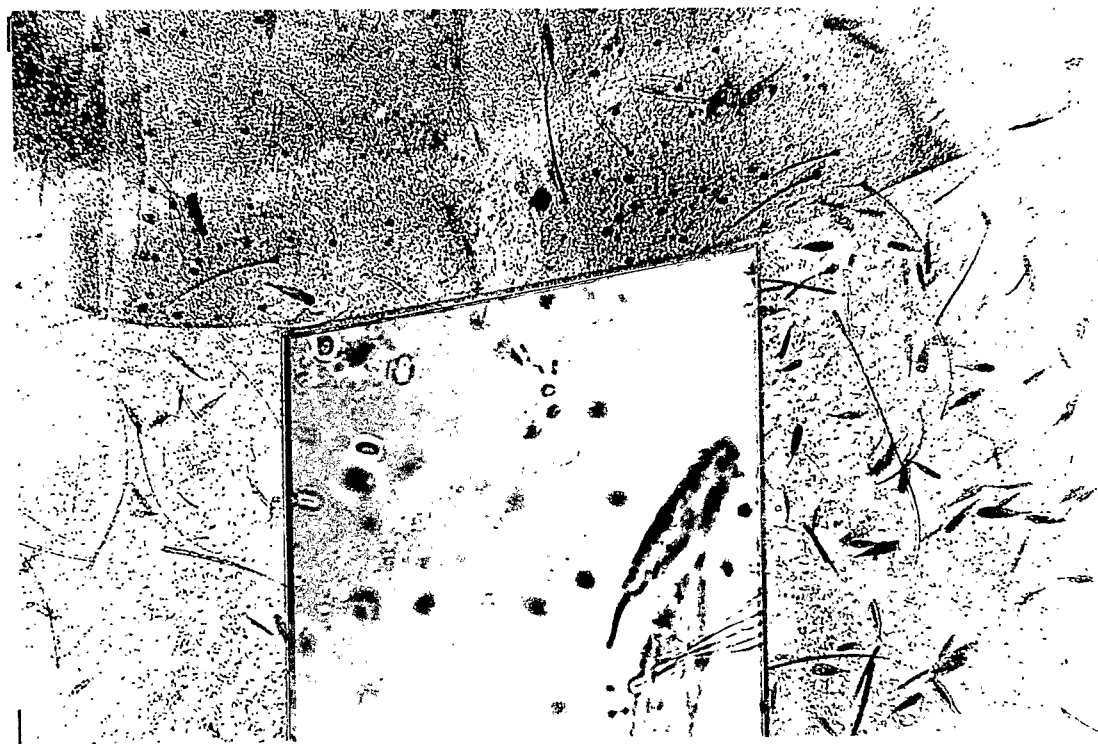
X 150



Anopheles stephensi - Larve  
4ème stade fortement infectée.  
X 120



Anopheles stephensi - Détail  
photo ci contre.  
X 1500



Anopheles stephensi  
adulte infecté.  
encadré : X 200



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALGER et al. (80). Nosema algerae : Infectivity and immune response in normal and nude mice. WHO/VBC/ 80.778, Geneva, 7 pages.

ALGER et UNDEEN (70). The control of a Microsporidian, Nosema sp, in an anopheline colony by an egg-rinsing technique. J.Invertebr.Pathol ; 15 : 321-327.

ANDREADIS et HALL (79). Significance of transovarial infections of Amblyospora sp. (Microspora : Thelohaniidae) in relation to parasite maintenance in the mosquito Culex salinarius. J.Invertebr.Pathol ; 34 : 152-157.

ANTHONY et al. (72). Nosematosis, its effect on Anopheles albimanus Wiedemann, and a population model of its relation to Malaria transmission. Proc.Helminthol.Soc.Wash ; 39 : 428-433.

ANTHONY et al. (78). Fecundity and longevity of Anopheles albimanus exposed at each larval instar to spores of Nosema algerae. Mosquito News ; 38 : 116-121.

ANTHONY et al. (78). Field tests with Nosema algerae, Vavra et Undeen against Anopheles albimanus Wiedemann in Panama. Misc.Pub.Entomol.Soc.Amer ; 11 : 17-29.

BURGES et al. (74). Ultrastructure of Nosema oryzaephili and the taxonomic value of the polar filament. J.Invertebr.Pathol ; 23 : 135-139.

CANNING et HULLS (70). A microsporidian infection of Anopheles gambiae Giles, from Tanzania, interpretation of its mode of transmission and notes on Nosema infections in Mosquitoes. J.Protozool ; 17(4) : 531-539.

COSTA et BRADLEY (80). Hyperparasitism of intrasnaill stages of Fasciola hepatica by a mosquito microsporidian parasite. J.Invertebr.Pathol ; 35 : 175-181.

FOX et WEISER (59). A Microsporidian parasite of Anopheles gambiae in Liberia. J.Parasitol ; 45(1) : 21-30.

GOCHNAUER et MARGETTS (80). A rapid method for concentrating Nosema apis spores. J.Invertebr.Pathol ; 36 : 278-280.

GRAY et al. (69). Intracellular stages in the life cycle of the Microsporidian Nosema apis. J.Invertebr.Pathol ; 14 : 391-394.

HAQ et al. (81). The effects of Nosema algerae on the horizontal life table attributes of Anopheles stephensi under laboratory conditions. J.Invertebr.Pathol ; 37 : 236-242.

HAZARD (72). Investigation of pathogens of Anopheline mosquitos in the vicinity of Kaduna, Nigeria. Mimeographed document WHO/VBC/ 72.384, Geneva, 6 pages.

HAZARD et LOFGREN (71). Tissue specificity and systematics of a Nosema in some species of Aedes, Anopheles, and Culex. J.Invertebr.Pathol ; 18 : 16-24.

HAZARD et WEISER (68). Spores of Thelohania in adult female Anopheles : Development and transovarial transmission, and redescrptions of T. legeri Hesse and T. obesa Kudo. J.Protozool ; 15(4) : 817-823.

HUGER (60). Electron microscope study of the cytology of Microsporidian spores by mean of ultrathin sectioning. J.Invertebr.Pathol ; 2 : 84-105.

ISHIHARA (68a). Some observations on the fine structure of sporoplasme discharged from spores of a Microsporidian, Nosema bombycis. J.Invertebr.Pathol ; 12 : 245-258.



ISHIHARA (69). The life cycle of Nosema bombycis as revealed in tissue culture cells of Bombyx mori. J.Invertebr.Pathol ; 14 : 316-320.

JAFRI et al. (76). Nosema infection in Anopheles stephensi larvae from Lahore, Pakistan. Pakistan J.Zool ; 8(2) : 232-234.

KELLY et ANTHONY (79). Susceptibility of spores of the Microsporidian Nosema algerae to Sunlight and Germicidal Ultraviolet Radiation. J.Invertebr.Pathol ; 34 : 164-169.

KELLY et KNELL (79). A simple method of cleaning Microsporidian spores. J.Invertebr.Pathol ; 33 : 252.

KELLEN et WILLS (62). The transovarian transmission of Thelohania californica Kellen and Lipa in Culex tarsalis coquillett. J.Insect.Pathol ; 4 : 321-326.

KNELL et ZAM (78). A serological comparison of some species of Microsporidia. J.Invertebr.Pathol ; 31 : 280-288.

KRINSKY (77). Nosema parkeri sp.n; a Microsporidian from the Argasid Tick, Ornithodoros parkeri Cooley. J.Protozool ; 24(1) : 52-56.

LEVINE et al. (80). A newly revised classification of the Protozoa. J.Protozool ; 27(1) : 37-58.

MADDOX et al. (77). The susceptibility of some Pakistan Mosquitoes to Nosema algerae (Microsporida). Pakistan J.Zool ; 9(1) : 19-22.

REYNOLDS (71). Parasitization of Culex fatigans by Nosema stegomyiae. J.Invertebr.Pathol ; 18 : 429.

SAFOIU et CALOIANU-IORDACHEL (78). New ultrastructural data on the development of the protozoan Nosema lymantriae (Weiser) (Microsporidia) intracellular parasite on Lymantria dispar L. (Lepidoptera). Trav.Mus.Hist.nat. "Grigore Antipa" ; 19 : 83-87.

SPRAGUE et al. (68). The fine structure of Nosema sp. Sprague, 1965. (Microsporidia, Nosematidae) with particular reference to stages in sporogony. J.Invertebr.Pathol ; 12 : 105-117.

STAINIER et al. (68). The fine structure of the spore of Nosema spelotremae, a microsporidian parasite of Spelotrema metacercaria, encysted in the crab Carcinus maenas. J.Invertebr.Pathol ; 12 : 73-82.

STREET et al. (80). Replication of Nosema algerae in three insect cell lines. J.Protozool ; 27(1) : 113-117.

TEETOR-BARSCH et KRAMER (79). The preservation of infective spores of Octosporea muscaedomestica in Phormia regina, of Nosema algerae in Anopheles stephensi, and of Nosema whitei in Tribolium castaneum by lyophilization. J.Invertebr.Pathol ; 33 : 300-306.

UNDEEN (75). Growth of Nosema algerae in Pig Kidney cell cultures. J.Protozool ; 22(1) : 107-110.

UNDEEN (76). In vivo germination and host specificity of Nosema algerae in mosquitos. J.Invertebr.Pathol ; 27 : 343-347.

UNDEEN et ALGER (71). A density gradient method for fractionating microsporidian spores. J.Invertebr.Pathol ; 18 : 419-420.

UNDEEN et ALGER (75). The effect of the microsporidian, Nosema algerae on Anopheles stephensi. J.Invertebr.Pathol ; 25 : 19-24.

UNDEEN et ALGER (76). Nosema algerae : Infection of the white Mouse by a Mosquito parasite. Experimental Parasitology ; 40 : 86-88.

UNDEEN et MADDIX (73). The infection of non mosquito hosts by injection with spores of the microsporidian Nosema algerae. J.Invertebr.Pathol ; 22 : 258-265.

VAN ESSEN et ANTHONY (76). Susceptibility of non target organisms to Nosema algerae (Microsporida : Nosematidae), a parasite of mosquitos. J.Invertebr.Pathol ; 28 : 77-85.

VAVRA (65). Etude au microscope électronique de la morphologie et du développement de quelques Microsporidies. C.R.Acad.Sc.Paris ; 261 : 3467-3470.

VAVRA (80). Microsporida affecting arthropod vectors. Third European Multicolloquium of Parasitology, Cambridge, England, September 12, 1980, Page 7.

VAVRA et UNDEEN (70). Nosema algerae n. sp. (Cnidospora , Microsporida) a pathogen in a laboratory colony of Anopheles stephensi Liston (Diptera, Culicidae). J.Protozoocl ; 17(2) : 240-249.

WEISER (59). Nosema laphygmae n.sp. and the internal structure of Microsporidian spore. J.Insect.Pathol ; 1 : 52-60.